

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 99-F-071PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO00/03806	国際出願日 (日.月.年) 12.06.00	優先日 (日.月.年) 14.06.99	
国際特許分類(IPC) Int.Cl ⁷ C12N15/29, C07K14/415			
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
II ☐ 優先権
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV ☐ 発明の単一性の欠如
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI ☐ ある種の引用文献
VII ☐ 国際出願の不備
VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.12.00	国際予備審査報告を作成した日 23.07.01		
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 小暮 道明 印	4B	9358
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)



1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ、図、 出願時に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ、図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 図面 第 _____ ページ、図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-6

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-4

有

請求の範囲

5, 6

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-6

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: FEBS Lett. 1998, 第429巻, p. 403-406

文献2: Nature 1997, 第389巻, p. 135-136

・請求の範囲5及び6

あるタンパク質をコードするDNAの一部配列からなる、いわゆるDNA断片を調製し、該DNAに対するプローブ、プライマー等に使用することは、本願優先日前から当業者の周知技術である。

ここで、文献1には、シロイヌナズナのUCPをコードするDNAが、その塩基配列とともに記載されているから、該塩基配列に基づき、DNA断片を調製することは、当業者が必要に応じて適宜なし得たことである。

そして、上記請求の範囲に記載された配列番号1及び3の塩基配列は、上記文献に記載された塩基配列とは一部相違するものではあるものの、該請求の範囲に記載の「その一部配列を有するDNA断片」については、上述の適宜調製し得たDNA断片と区別できないものであり、その効果についても、顕著なものは認められない。

したがって、上記請求の範囲に記載された発明は、文献1の記載に基づいて、当業者が容易になし得たものであるから、進歩性がない。

・請求の範囲1-4

上記請求の範囲に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1及び2に対して進歩性を有する。

文献1及び2には、ザゼンソウ由来であって、配列番号1又は3の塩基配列を有するDNAが記載されておらず、しかもその点は、本願優先日前の技術水準を考慮しても、当業者といえども容易には想到し得ないものである。





P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号	99-F- 071PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/03806	国際出願日 (日.月.年)	12.06.00	優先日 (日.月.年) 14.06.99
出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/29, C07K14/415

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/29, C07K14/415

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/DBJ/EMBL/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Ito, K. "Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (<i>Symplocarpus foetidus</i>)" <i>Plant Science</i> (1999, Dec.) 第149巻 第2号 p. 167-173	1-6
PX	Ito, K. "A cold-inducible gene encoding uncoupling protein in thermogenic plant species" <i>Cryobiology and Cryotechnology</i> (1999, Dec.) 第45巻 第2号 p. 43-46	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PY	Ricquier, D. et al. "The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP" Biochem. J. (2000) 第345巻 第2号 p. 161-179	1-6
PY	Watanabe, A. et al. "AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of Arabidopsis thaliana" Plant Cell Physiol. (1999, Nov.) 第40巻 第11号 p. 1160-1166	1-6
<u>X</u> A	Maia I. G. et al. "AtPUMP: an Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein" FEBS lett. (1998) 第429巻 p. 403-406	<u>5-6</u> 1-4
<u>X</u> A	Laloi, M. et al. "A plant cold-induced uncoupling protein" Nature (1997) 第389巻 p. 135-136	<u>5-6</u> 1-4



P A T E N T COOPERATION TREAT Y

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 31 January 2001 (31.01.01)	
International application No. PCT/JP00/03806	Applicant's or agent's file reference 99-F-071PCT
International filing date (day/month/year) 12 June 2000 (12.06.00)	Priority date (day/month/year) 14 June 1999 (14.06.99)
Applicant ITO, Kikukatsu	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

27 December 2000 (27.12.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3T
Translation

Applicant's or agent's file reference 99-F-071PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03806	International filing date (<i>day month year</i>) 12 June 2000 (12.06.00)	Priority date (<i>day month year</i>) 14 June 1999 (14.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/29, C07K 14/415		
Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 December 2000 (27.12.00)	Date of completion of this report 23 July 2001 (23.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03806

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03806

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-4	YES
	Claims	5,6	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: FEBS Lett. Vol. 429, 1998, pp. 403-406

Document 2: Nature, Vol. 389, 1997, pp. 135-136

Claims 5 and 6

The preparation of a partial sequence of DNA that codes for a specific protein, i.e., a so-called DNA fragment, and the use of that fragment as a probe, primer and the like was widely known technology to persons skilled in the art prior to the priority date of this application.

Document 1 describes DNA that codes for the UCP of *Arabidopsis thaliana* and its base sequence, and persons skilled in the art can prepare as needed a DNA fragment based on that base sequence.

The base sequences represented by Sequence ID Nos. 1 and 3 set forth in the above Claims differ in part from the base sequences described in the above document, but they are indistinguishable from the DNA fragments obtained in the aforementioned preparation with respect to the "DNA fragment having a partial sequence thereof" described in these Claims, and this examination finds no particularly outstanding effect thereby.

As a result, persons skilled in the art could easily obtain the inventions set forth in these Claims based on the description in document 1, and these inventions do not appear to involve an inventive step.

Claims 1-4

The inventions set forth in these Claims appear to involve an inventive step with respect to documents 1 and 2 cited in the international search report.

Documents 1 and 2 do not describe DNA originating in *Symplocarpus renifolius* and having the sequences represented by Sequence ID Nos. 1 and 3, and in light of the level of technology prior to the priority date of this application, persons skilled in the art could not easily conceive of these matters.



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 12 月 21 日 (21.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/77211 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/29, C07K 14/415 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03806 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊藤菊一 (ITO, Kikukatsu) [JP/JP]; 〒020-0117 岩手県盛岡市緑が丘 1-17-7 エステート緑が丘207 Iwate (JP).
(22) 国際出願日: 2000 年 6 月 12 日 (12.06.2000) (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).
(25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CA, US.
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願平11/167439 1999 年 6 月 14 日 (14.06.1999) JP 添付公開書類:
— 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP). 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PYREXIA-ASSOCIATED GENES AND PYREXIA-ASSOCIATED PROTEINS OF PLANT

(54) 発明の名称: 植物の発熱関連遺伝子と発熱関連タンパク質

(57) Abstract: Genes SfUCPa and SfUCPb which are pyrexia-associated genes originating in *Symplocarpus renifolius* characterized in that cDNAs thereof have the base sequences respectively represented by SEQ ID NOS:1 and 3; proteins SfUCPA and SfUCPB which are pyrexia-associated proteins expressed by these genes characterized by having the amino acid sequences of SEQ ID NOS: 2 and 4 respectively; and the cDNAs of the above genes.

(57) 要約:

WO 00/77211 A1

この出願の発明は、ザゼンソウ由来の発熱関連遺伝子であって、その cDNA が配列番号 1 および 3 の塩基配列をそれぞれ有することを特徴とする遺伝子 SfUCPa および SfUCPb、これら遺伝子が発現する発熱関連タンパク質であって、配列番号 2 および 4 のアミノ酸配列をそれぞれ有することを特徴とするタンパク質 SfUCPA および SfUCPB、ならびに前記遺伝子の各々の cDNA である。



明細書

植物の発熱関連遺伝子と発熱関連タンパク質

5 技術分野

この出願の発明は、植物の発熱関連遺伝子と発熱関連タンパク質に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、低温耐性植物の開発等の植物育種分野、糖尿病や肥満等の治療に関する医学分野、植物由来の新規発熱素材開発等の工学分野において有用なザゼンソウ (*Symplocarpus foetidus*) 由来の発熱関連遺伝子とこの遺
10 伝子の発現産物である発熱関連タンパク質に関するものである。

背景技術

低温、乾燥および塩ストレスは、陸棲植物が遭遇する共通の有害な環境因子である。これらのストレスのうち、低温傷害および凍結傷害を引き起こす低温は作物の生産性を制限する最も重要な因子であると考えられている (Levitt, 1980)。これらの低温
15 ストレスに対処するために、コムギやライムギのような耐冷植物は低温馴化を導く多くの生理学的応答および代謝応答を行う (Sakai and Larcher, 1987; Steponkus, 1984; Thomashow, 1998; Uemura and Steponkus, 1997)。対照的に、ザゼンソウを含むいくつかの植物は熱発生によって冷却化を回避する特殊化された機構を有している
20 ことが知られている (Knutson, 1974; Nagy et al., 1972; Schneider and Buchenen, 1980)。

早春に咲くザゼンソウの肉穂花序 (spadix) における花の温度は、大気温度が -15°C に低下する場合であっても $+10^{\circ}\text{C}$ よりも高いままである (Knutson, 1974)。例えば、
25 図 1 は、屋外で採取したザゼンソウを人工気象室内に移し、部屋の温度を低下させた際の肉穂花序の温度を赤外線カメラで測定した結果である。この図 1 から明らかなように、ザゼンソウの肉穂花序の温度は気温が低下してもほぼ 19°C を保っている。

このような温度維持は、 12°C から氷点下の温度レベルに呼吸速度を倍増することに

よって達成されている。熱発生植物によって生成される熱は植物のミトコンドリアに特有の経路、すなわち代替オキシダーゼ (AOX) によって調節されるミトコンドリアのシアン化物非感受性・非リン酸化電子輸送経路の活性増加に関連すると考えられてきた (Berthold and Siedow, 1993; Ito et al., 1997; McIntosh, 1994; Wangner and Krab, 1995)。

一方、哺乳動物においては、脱共役タンパク質 (uncoupling protein: UCP) と呼ばれるミトコンドリアタンパク質が熱産生において重要な役割を果たすことが示されてきた。ミトコンドリアの内膜において見出される UCPs は、膜内に H^+ を流入させることによって、化学エネルギーを代謝熱へと散逸させる ATP 合成から呼吸を脱共役する (Klaus et al., 1991; Klingenberg and Winkler, 1985; Ricquier et al., 1991)。動物においては、3つの UCP が見出されている。UCP1 は主として褐色脂肪組織に分布し (Nichollus and Locke, 1984)、UCP2 は多くの組織において偏在的に見出され (Fleury et al., 1997)、UCP3 は骨格筋に極めて特異的である (Boss et al., 1997)。

哺乳動物 UCPs は、ミトコンドリアの他のキャリアタンパク質と同様に、6つの膜貫通セグメントから構成され、その疎水性部分是对合した両親媒性 α -ヘリックス構造に由来すると考えられている (Liu et al., 1988; Maia et al., 1998)。さらに、これらの UCPs の活性は、プリンヌクレオチド (ATP、GTP、GDP および ADP) を C 末端領域に結合することによって低下し、遊離脂肪酸によって増加することも知られている (Jezek et al., 1998; Lin and Klingenberg, 1982; Katiyar and Shrago, 1989; Rial et al., 1983; Sluse et al., 1998)。

これに対して、近年、植物由来の UCP 様タンパク質をコードする2つの cDNA が、ジャガイモ (StUCP: Laloi et al., 1997) およびシロイヌナズナ (AtPUMP: Maia et al., 1998) から単離された。StUCP の発現は主として花および果実において検出されたため、AOX と共に、開花および果実熟成において激発する呼吸に関連し得ると仮定されている (Laloi et al., 1997)。

ジャガイモおよびシロイヌナズナは非熱発生植物であると考えられているが、StU

CP および AtPUMP の低温誘導性発現は、これらの遺伝子が熱発生に関与していることを示唆する (Laloi et al., 1997 ; Maia et al., 1998)。

しかしながら、ザゼンソウのような熱発生植物において、UCP 様タンパク質が媒介する熱生成の分子機構は全く同定されていない。

5

この出願の発明は、これまでに同定されていない熱発生植物ザゼンソウ由来の新規 UCP 遺伝子を提供することを課題としている。

またこの出願は、この新規遺伝子の発現産物であるザゼンソウ UCP を提供することを課題としてもいる。

10

発明の開示

この出願は、ザゼンソウ由来の発熱関連遺伝子であって、cDNA が配列番号 1 の塩基配列を有することを特徴とする遺伝子 SfUCPa と、cDNA が配列番号 3 の塩基配列を有することを特徴とする遺伝子 SfUCPb を提供する。

15

またこの出願は、前記の遺伝子 SfUCPa が発現する発熱関連タンパク質であって、配列番号 2 のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質 SfUCPA と、前記の遺伝子 SfUCPb が発現する発熱関連タンパク質であって、配列番号 4 のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質 SfUCPB をそれぞれ提供する。

20

さらにこの出願は、配列番号 1 の塩基配列またはその一部配列を有する cDNA と、配列番号 3 の塩基配列またはその一部配列を有する cDNA とをそれぞれ提供する。

25 図面の簡単な説明

図 1 は、ザゼンソウの肉穂花序の温度と気温の経時的変化を示したグラフである。

図 2 は、室温 (RT) および冷却条件 (4 °C、3 日間) での、ザゼンソウの肉穂花序および葉における SfUCPa (A) および SfUCPb (B) 転写産物の発現プロフィール

を示したノーザンブロッティングの結果である。各々の下側の図は、未分解の rRNA をエチジウムブロマイド染色した結果である。

図 3 は、SfUCPA および SfUCPB と、既存のジャガイモ UCP (StUCP)、シロイヌナズナ UCP (AtPUMP) およびヒト UCP のアミノ酸配列比較図である。配列下段の星記号 (*) は同一アミノ酸残基を示し、点記号 (.) は全ての配列内での保存的な変化を表す。太字は、SfUCPA と SfUCPB との同一配列を示す。配列アラインメントを最適化するために導入したギャップをダッシュ記号 (—) で示す。アラインメントは、CLUSTAL W プログラムを用いて行った。典型的なミトコンドリアエネルギー伝達タンパク質の特徴的ドメインを四角で囲む。配列上段の斜線横軸 (I ~ VI) は予測される膜貫通ドメインを示す。

図 4 は、SfUCPA の疎水性プロットである。縦軸は疎水性の程度を示し、予想される膜貫通ドメインを TM1 から TM6 で示した。

図 5 は、ミトコンドリア膜内における SfUCPA のトポロジーの模式図である。

図 6 は、SfUCPB の疎水性プロットである。縦軸は疎水性の程度を示し、予想される膜貫通ドメインを TM1 から TM4 および TM6 で示した。

図 7 は、ミトコンドリア膜内における SfUCPB のトポロジーの模式図である。

図 8 は、遺伝子 SfUCPa および SfUCPb の各々の cDNA を鋳型とするインビトロ翻訳の結果である。(—) はコントロール、S はセンス RNA、AS はアンチセンス RNA を示す。星印記号 (*) は非特異的産物であり、白丸は小さな ORF によって合成された低分子量の翻訳人工産物の位置を示す。

発明を実施するための最良の形態

この発明の遺伝子 SfUCPa は、その cDNA が配列番号 1 の塩基配列を有しており、この cDNA が配列番号 2 のアミノ酸配列を有する推定分子量 32.6kDa のタンパク質 SfUCPA をコードしている。また、この発明の遺伝子 SfUCPb の cDNA (配列番号 3) は、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する推定分子量 29.0kDa のタンパク質 SfUCPB をコードしている。

この発明の遺伝子 SfUCPa および SfUCPb は、低温時に肉穂花序特異的に発現するザゼンソウ遺伝子である。すなわち、公知の方法 (Ito et al., 1999) により抽出したザゼンソウ全 RNA についてノーザンブロッティング (Ito et al., 1994) を行った結果、図 2 に示したように、室温 (15°C) において両遺伝子とも肉穂花序での発現が検出されたが、葉では検出されないことが確認されている。また、肉穂花序に特異的な両遺伝子の発現は、低温処理 (4°C、3 日間) によって誘導されることも確認されている。

この出願の遺伝子がそれぞれに発現するタンパク質 SfUCPA および SfUCPB のアミノ酸配列は、ホモロジー検索の結果、ヒト UCP に対してよりも、植物 UCP に対してより高い相同性を示す (図 3)。すなわち、SfUCPA のアミノ酸配列は、StUCP、AtPUMP、ヒト UCP、UCP2 および UCP3 に対して、それぞれ、79%、75%、44%、48% および 48% 同一である。SfUCPB は StUCP、AtPUMP、ヒト UCP、UCP2 および UCP3 に対して、それぞれ、71%、66%、41%、43% および 44% 同一である。

また、SfUCPA および SfUCPB は互いに高い配列同一性 (88%) を示すが、図 3 に示したように、SfUCPA の第 204 番目 Thr と第 238 番目 Val との間のアミノ酸配列に対応する領域が、SfUCPB においては完全に欠失している。さらに、SfUCPA の第 265 番目の Leu は、SfUCPB では Pro に置換されている。

SfUCPA は、他のミトコンドリア UCP タンパク質と同様の構造を有している。すなわち、SfUCPA は、図 4 に疎水性プロットを示したとおりに 6 カ所の膜貫通ドメインを有し、そのトポロジーは図 5 に示したとおりである。加えて、この SfUCPA はミトコンドリアエネルギー伝達タンパク質に特徴的なドメイン (Boss et al., 1997 ; Maia et al., 1998) を 3 カ所に有している (図 3)。一方、SfUCPB は、3 番目のミトコンドリアエネルギー伝達タンパク質特徴的ドメインを欠損しているとともに (図 3)、5 番目の膜貫通ドメインが欠失しており (図 3 および図 6)、そのトポロジーは C 末端がミトコンドリアのマトリックス側に向いている (図 7)。

いずれもタンパク質も C 末端にプリンヌクレオチド結合ドメイン (PNBD) を有しているが (図 3、図 5 および図 7)、UCP はプリンヌクレオチドの結合によりミトコンドリア内膜における脱共役機能が抑制されることが知られている。しかし、SfUCPB は C 末端がミトコンドリアのマトリックス側に向いていることから、プリンヌクレオチドの結合による活性抑制を免れている可能性がある。このようなトポロジーを有する UCP は動物、植物を問わず従来全く知られていない。

この出願によって提供されるザゼンソウ由来の発熱関連遺伝子 SfUCPa および SfUCPb は、例えば、遺伝子組換え技術を用いた低温耐性植物の開発に極めて有用である。また、この遺伝子の発現産物であるタンパク質 SfUCPa および SfUCPB は、ATP 合成に対する脱共役機能により、糖尿病や肥満等の治療薬の有効成分等として期待される。さらには、このような発熱関連タンパク質は植物由来の新規発熱素材としても有望である。

この発明の遺伝子 SfUCPa および SfUCPb は、各々、この発明の各 cDNA (配列番号 1 または 3) もしくはそれらの一部配列をプローブとして、ザゼンソウのゲノム DNA から単離することができる。例えば、ゲノム DNA から公知の方法によりゲノムライブラリーを作成し、cDNA の任意部分の塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして、公知の方法によりコロニーあるいはブラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行えばよい。あるいは、染色体に対する in situ ハイブリダイゼーションによって目的の遺伝子領域を同定することもできる。

この発明の各 cDNA は、例えば、ザゼンソウのポリ(A)⁺RNA を鋳型として合成した cDNA ライブラリーからクローン化することができる。その場合には、この発明によって提供される cDNA の任意部分のオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いて、公知の方法によりコロニーあるいはブラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行えばよい。また、目的とする cDNA 断片の両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、ザゼンソ

ウ細胞から単離した mRNA から RT-PCR 法により、この発明の cDNA を調製することもできる。

なお、一般に真核細胞の遺伝子は多型が頻繁に認められる。従って配列番号 1 および 3 において、1 または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされている cDNA もこの発明の cDNA に含まれる。同様に、
5 これらの塩基の変更によって生じる 1 または複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸による置換がなされているタンパク質もこの発明に含まれる。

この発明の cDNA には、配列番号 1 および 3 の塩基配列のいかなる部分配列を含む
10 DNA 断片 (10bp 以上) も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなる DNA 断片も含まれる。

この発明のタンパク質 SfUCPA および SfUCPB は、それぞれ公知の方法、すなわちザゼンソウの肉穂花序などから単離する方法、この出願によって提供されるアミノ酸
15 配列に基づいて化学合成によりペプチドを調製する方法、あるいはこの出願によって提供される cDNA を用いて組換え DNA 技術で生産する方法などにより取得することができる。例えば、組換え DNA 技術によってタンパク質を取得する場合には、この発明の cDNA を保有するベクターからインビトロ転写によって RNA を調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことにより、タンパク質を得ることができる。
20 また cDNA の翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換え、この組換えベクターで大腸菌、枯草菌、酵母、動植物細胞等を形質転換すれば、これらの形質転換体でタンパク質を大量に発現させることができる。

この発明のタンパク質をインビトロ翻訳で生産させる場合には、RNA ポリメラーゼ
25 プロモーターを有するベクターにこの発明の cDNA の翻訳領域を組換え、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すればよい。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。

また、この発明のタンパク質を大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、この発明の cDNA の翻訳領域を組
5 換えて発現ベクターを作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養すればよい。この際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと停止コドンが付加すれば、任意の領域を含むタンパク質断片を得ることができる。あるいは、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させ、この融合タンパク質を適当なプロテアーゼで切断することによって目的とするタンパク質のみを取得する
10 こともできる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

この発明のタンパク質を真核細胞で発現させる場合には、この発明の cDNA の翻訳領域を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用
15 発現ベクターに組換え、真核細胞内に導入する。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EVB ベクター、pRS、pYES2 などが例示できる。真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、これらに限定されるものではない。発現
20 ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

上記の方法により原核細胞や真核細胞でタンパク質を発現させたのち、培養物から目的タンパク質を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行う。例え
25 ば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー等である。

この発明のタンパク質 SfUCPA および SfUCPB には、配列番号 2 および 4 のアミノ酸配列におけるいかなる部分配列を含むペプチド断片（5 アミノ酸残基以上）も含まれる。また、この発明のタンパク質には、他の任意のタンパク質との融合タンパク質も含まれる。

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

10 実施例 1 : cDNA のクローニング

ザゼンソウの肉穂花序から全 RNA を抽出し、1.0%アガロースゲル電気泳動によって完全な RNA を決定した (Ito et al., 1999)。mRNA 単離キット (Pharmacia) を用いて精製したポリ(A)⁺RNAから RT-PCR 法によりUCP 遺伝子ファミリーの関連クローンを単離した。第 1 鎖 cDNA は、ポリ(A)⁺RNA (0.1 μ g) に 20pmol の cDNA プライム化
15 プライマー (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3') をアニールし、次いで 10 ユニットの逆転写酵素 (New England Biolab) を使用して、37°C で 30 分間、10mM 1, 4-ジチオトレイトールおよび 0.5mM dNTP を含有する 20 μ l の 1 \times RT 緩衝液中で伸長した。反応溶液の組成は以下のとおりである。

- ・ 10mM Tris-HCl (pH8.0) ;
- 20 ・ 50mM KCl ;
- ・ 1.5mM MgCl₂ ;
- ・ 4 mM dNTP ;
- ・ 0.2 ユニットの EX Taq ポリメラーゼ (Takara) ; および
- ・ UCP ファミリーの保存されたアミノ酸配列に対応する 10pmol の 2 つの縮重
25 プライマー :

 ZF1 (5'-CCIYTIGAYACIGCIAAR-3') ;

 ZR1 (5'-ACWTTCCAISYICCIAWIC-3')

また、PCR サイクルは以下のとおりとした。

(94°C : 0.5 分間、50°C : 1 分間、72°C : 1 分間) × 35

以上の方法により得た PCR 産物のうち、約 0.8kb の cDNA フラグメントの配列から推定されるアミノ酸配列は、UCP 遺伝子群の 1 つのリーディングフレーム配列と極めて高い相同性を示したので、このフラグメントを T-ベクターにクローニングし（クローン p2-1）、ライブラリースクリーニングのためのプローブとした。

肉穂花序から調製したポリ(A)⁺RNA (5 μg) を公知の方法 (Sambrook et al., 1989) によって λgt11 ファージに挿入し、cDNA ライブラリーを構築した。このライブラリーから前記プローブに対するポジティブクローン 8 個を単離し、pBluescript SK プラスミド (Stratagene) にサブクローニングした。そして、これらのクローンから、完全長の SfUCPa cDNA および SfUCPb cDNA をそれぞれ保有するクローン pz8-1 および pz8-2 を得た。

なお、各クローンのインサートは、BcaBest 配列決定キット (Takara) ならびに T3、T7 および遺伝子特異的プライマーを用い、ABI373A 自動化シーケンサーにより配列決定した。配列データを、GENETYX-Homology ソフトウェアシステム・バージョン 2.2.0 (Software Development) を使用して解析した。

SfUCPa の cDNA は、配列番号 1 に示した 1,525bp の塩基配列を有しており、SfUCPb の cDNA は配列番号 3 に示した 2,991bp の塩基配列を有していた。推定のポリアダニル化シグナル (aataaa) は、SfUCPa の cDNA ではポリ(A)配列から 236bp 上流で見出されたが、SfUCPb の cDNA では 1,171bp および 1,243bp の位置に 2 つのポリアダニル化部位が認められた。SfUCPa に比較して SfUCPb の cDNA が長い 3' 非翻訳領域を含むという事実は注目に値する。

また、SfUCPa の cDNA は、配列番号 1 に示したように、303 アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) を含んでおり、この ORF には配列番号 2 に示したアミノ酸配列を有する推定分子量 32.6kDa のタンパク質 SfUCPA がコードされていた。一方、SfUCPb の cDNA は、配列番号 3 に示したように、268 アミノ酸の ORF を含んでおり、この ORF には推定分子量 29.0kDa のタンパク質 SfUCPB がコードされていた。

さらに、サザンブロット分析の結果から、ザゼンソウのゲノムは SfUCPa 遺伝子を

複数コピー、SfUCPb 遺伝子を単一コピー含んでいることが確認された（データ示さず）。

実施例 2 : cDNA のインビトロ翻訳

- 5 実施例 1 で得たプラスミドクローン pz8-1 および pz8-2 を直線化し、T7 RNA ポリメラーゼまたは T3 RNA ポリメラーゼを使用して、MAXICRIPT 転写キット (Ambion) のプロトコルに従い、センスまたはアンチセンス RNA を転写した。等量の RNA (4 μ g) を 35 S-メチオニン (Amersham) の存在下でコムギ胚抽出物 (Promega) を用いたインビトロ翻訳反応に供した。翻訳産物は SDS-PAGE で分析した。ゲルを固定し、
- 10 Amplify (Amersham) 中でインキュベートした後に乾燥し、蛍光分析した。

その結果、図 8 に示したように、いずれの cDNA ともセンス RNA を鋳型とした時にのみ予想された分子量のタンパク質が産生されることから、実施例 1 で単離した cDNA の開始コドンおよび終始コドンが正しく機能していることが確認された。

15 産業上の利用可能性

- 以上詳しく説明したとおり、この出願によって、熱発生植物であるザゼンソウ由来の新規発熱関連遺伝子 SfUCPa および SfUCPb、並びにこれらの遺伝子産物である発熱関連タンパク質 SfUCPA および SfUCPB、さらにはこれらのタンパク質を遺伝子工学的に大量生産するための遺伝子 cDNA が提供される。これらの遺伝子およびタン
- 20 パク質によって、低温耐性植物の開発、糖尿病や肥満等の治療薬および治療方法の開発、植物由来の新規発熱素材の開発等が可能となる。

参考文献

- Berthold and Siedow (1993) Plant Physiol. 101, 113-119.
- 25 Boss et al. (1997) FEBS Lett. 408, 39-42.
- Fleury et al. (1997) Nature Genetics 15, 269-272.
- Ito, K. et al. (1999) Plant Sci. 142, 57-65.
- Ito, K. et al. (1994) Nucl. Acids Res. 22, 2036-2041.

- Ito, Y. et al. (1997) *Gene* 12, 121-129.
- Jezek et al. (1998) *Biochem. Biophys. Acta* 1365, 319-327.
- Katiyar and Shrago (1989) *Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2559-2562.
- Klaus et al. (1991) *Int. J. Biochem.* 23, 791-810.
- 5 Klingenberg and Winkler (1985) *EMBO J.* 4, 3087-3092.
- Knutson (1974) *Science* 186, 746-747.
- Laloi et al. (1997) *Nature* 389, 135-136.
- Levitt (1980) *Responses of plants to environmental stresses*. 2nd edn. New York: Academic Press.
- 10 Lin and Klingenberg (1982) *Biochemistry* 21, 2950-2956.
- Liu et al. (1988) *J. Cell. Biol.* 107, 503-509.
- Maia et al. (1998) *FEBS Lett.* 429, 403-406.
- McIntosh (1994) *Plant Physiol.* 105, 781-786.
- Nagy et al. (1972) *Science* 178, 1195-1197.
- 15 Nicholls and Locke (1984) *Physiol. Rev.* 64, 1-64.
- Rial et al. (1983) *Eur. J. Biochem.* 137, 197-203.
- Ricquier et al. (1991) *FASEB J.* 5, 2237-2242.
- Sakai and Larcher (1987) *Frost Survival of Plants: Responses and Adaptations to Freezing Stresses*. Berlin and New York: Springer-Verlag.
- 20 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd eds, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider and Buchanan (1980) *Amer. J. Bot.* 67, 182-193.
- Sluse et al. (1998) *FEBS Lett.* 433, 237-240.
- Steponkus (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 543-581.
- 25 Thomashow (1998) *Plant Physiol.* 118, 1-7.
- Uemura and Steponkus (1997) *Plant Cold Hardiness: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology* (Li and Chen, edn). New York: Plenum Press, pp. 171-179.
- Wagner and Krab (1995) *Physiol. Plant.* 95, 318-325.

請求の範囲

1. ザゼンソウ由来の発熱関連遺伝子であって、その cDNA が配列番号 1 の塩基配列を有することを特徴とする遺伝子 SfUCPa。

5

2. ザゼンソウ由来の発熱関連遺伝子であって、その cDNA が配列番号 3 の塩基配列を有することを特徴とする遺伝子 SfUCPb。

3. 請求項 1 の遺伝子 SfUCPa が発現する発熱関連タンパク質であって、配列番号 10 2 のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質 SfUCPA。

4. 請求項 2 の遺伝子 SfUCPb が発現する発熱関連タンパク質であって、配列番号 4 のアミノ酸配列を有することを特徴とするタンパク質 SfUCPB。

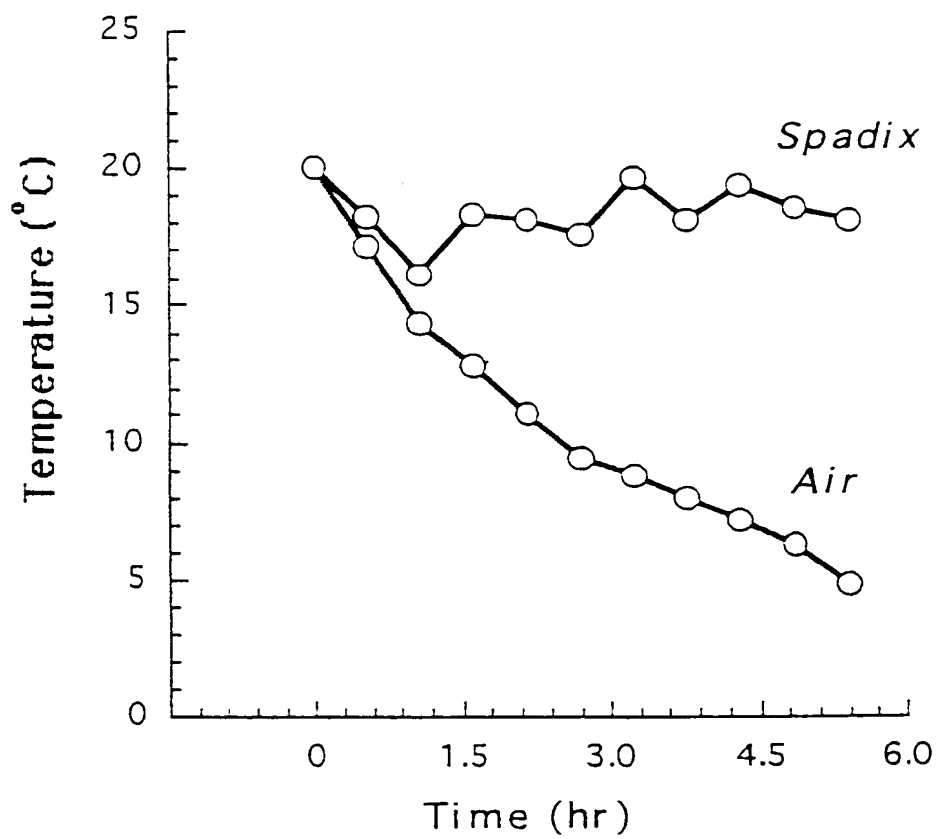
15 5. 配列番号 1 の塩基配列またはその一部配列を有する DNA 断片。

6. 配列番号 3 の塩基配列またはその一部配列を有する DNA 断片。



1/8

☒ 1





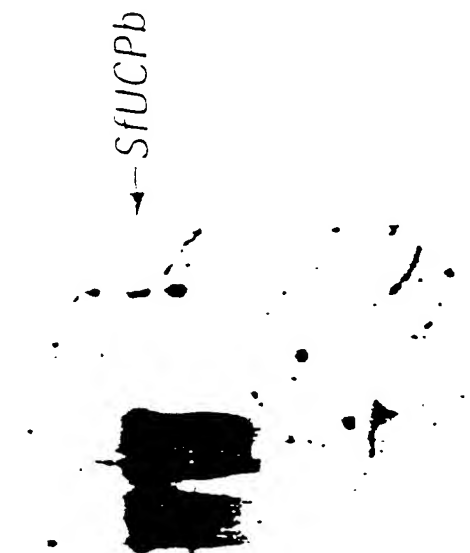
2/8

2

B

Spadix Leaf

RT Cold RT Cold



A

Spadix Leaf

RT Cold RT Cold

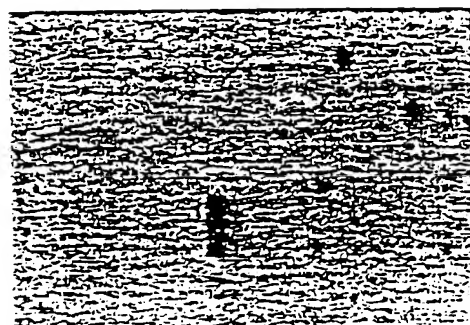




図 3 上

I

SfUCPA	1	--MGDHGPRTEISFAGSSR-AAFAACFAELCT	PLDTAKVRLQLQKAVTGDV-VALPKY	56
SfUCPB	1	--MGDHGPRTEISFAGSSR-AAFAACFAELCT	PLDTAKVRLQLQKAVTGDV-VALPKY	56
StUCP	1	MGGGDHGGKSDISFAGIFASSAFACFAEACTLP	LDLDTAKVRLQLQKAVEGDG-LALPKY	59
AtPUMP	1	--MVAAGKSDLSLPKTFACSAFAACVGEVCTTP	LDLDTAKVRLQLQKSAFTLAGDVTLPKY	57
human UCP1	1	-MGGLTASDVHPTLVQVLFSAPIAACLADVITH	PLDTAKVRLQVQGECP-----TSSVIRY	55
human UCP2	1	-MVGFKATDVPPPTATVKFLGAGTAACIADLI	THPLDTAKVRLQIQGESQGPVRATASAQY	59
human UCP3	1	-MVGLKPSDVPPPTMAVKFLGAGTAACFADLV	THPLDTAKVRLQIQGENQ-AVQRTARLVQY	58

II

SfUCPA	57	RGMLGTVATIAREEGLSALWKGI	VPGLHRQCLFGGLRIGLYEPVKSFYVG--DNFVGDIP	114
SfUCPB	57	RGMLGTVATIAREEGLSALWKGI	VPGLHRQCLFGGLRIGLYEPVKSFYVG--DNFVGDIP	114
StUCP	60	RGLLGTVGTIAKEEGLASLWKGI	VPGLHRQCIYGGLRIGMYEPVKNLYVG--KDHVGDVP	117
AtPUMP	58	RGLLGTVGTIAAREEGLRSLWKGV	VPGLHRQCLFGGLRIGMYEPVKNLYVFTGKDFVGDVP	117
human UCP1	56	KGVLGTITAVVKTEGRMKLYSGL	PAGLQRQISSASLRIGLYDTVQEFLLTA---GKETAPS	112
human UCP2	60	RGVMGTILTMVTEGPRSLYNG	LVAGLQRQMSFASVRIGLYDSVKQFYT----KGSEHAS	115
human UCP3	59	RGVLGTILTMVTEGPCSPYNG	LVAGLQRQMSFASIRIGLYDSVKQVYTP----KGADNSS	115



図 3 中

III

SfUCPA	115	LSKKILAGLTGALAIIVANPTDLVKVRLQSEGKLP	PG--VPRRYSGALNAY--STIVKRE	171
SfUCPB	115	LSKKILAGLTGALAIIVANPTDLVKVRLQSEGKLP	PG--VPRRYSGALNAY--STIVKRE	171
StUCP	118	LSKKILAGLTGALGITIANPTDLVKVRLQAECKLP	AG--VPRRYSGALNAY--STIVKQE	174
AtPUMP	118	LSKKILAGLTGALGIMVANPTDLVKVRLQAECKLA	AG--APRRYSGALNAYFTSTIVRQE	176
human UCP1	113	LSKKILAGLTGAVFICQPTLVVKVRLQAQSHLHG	--IKPRYTGTYNAY--RIIATTE	168
human UCP2	116	IGSRLLAGSTTGALAVAVACPTDVVKVRFQAQAR	AG---GGRRYQSTVNAY--KTIAREE	170
human UCP3	116	LTTRIILAGCTTGAMAVTCAQPTDVVKVRFQAS	IHLPSSDRKYSGMTDAY--RTIAREE	173

. ** *

IV

SfUCPA	172	GLGALWTGLGPNIAARNAIINAAELASYDQVKQT	ILKLPGFSDNIFTHILAG--LGAGFFA	229
SfUCPB	172	GLGALWTGLGPNIAARNAIINAAELASYDQVKQ	-----	203
StUCP	175	GVRALWTGLGPNIGRNAIINAAELASYDQVKEA	VLRIPEGFTDNVVTHLIAG--LGAGFFA	232
AtPUMP	177	GVRALWTGLGPNVARNAIINAAELASYDQVKET	ILKIPGFTDNVVTHILSGLFTGAGFFA	236
human UCP1	169	GLTGLWKGTTPNLMRSVIINCTELVTYDLMKEA	FVKNNILADDDVPCHLVSA--LIAGFCA	226
human UCP2	171	GFRGLWKGTSPNVARNAIIVNCAELVTYDLIKD	ALLKANLMTODLPCHFTSA--FGAGFCT	228
human UCP3	174	GVRGLWKGTLPNIMRNAIIVNCAEVVTYDILKE	KLLDYHLLTDNFPCHFVSA--FGAGFCA	231

*. . . . ** *

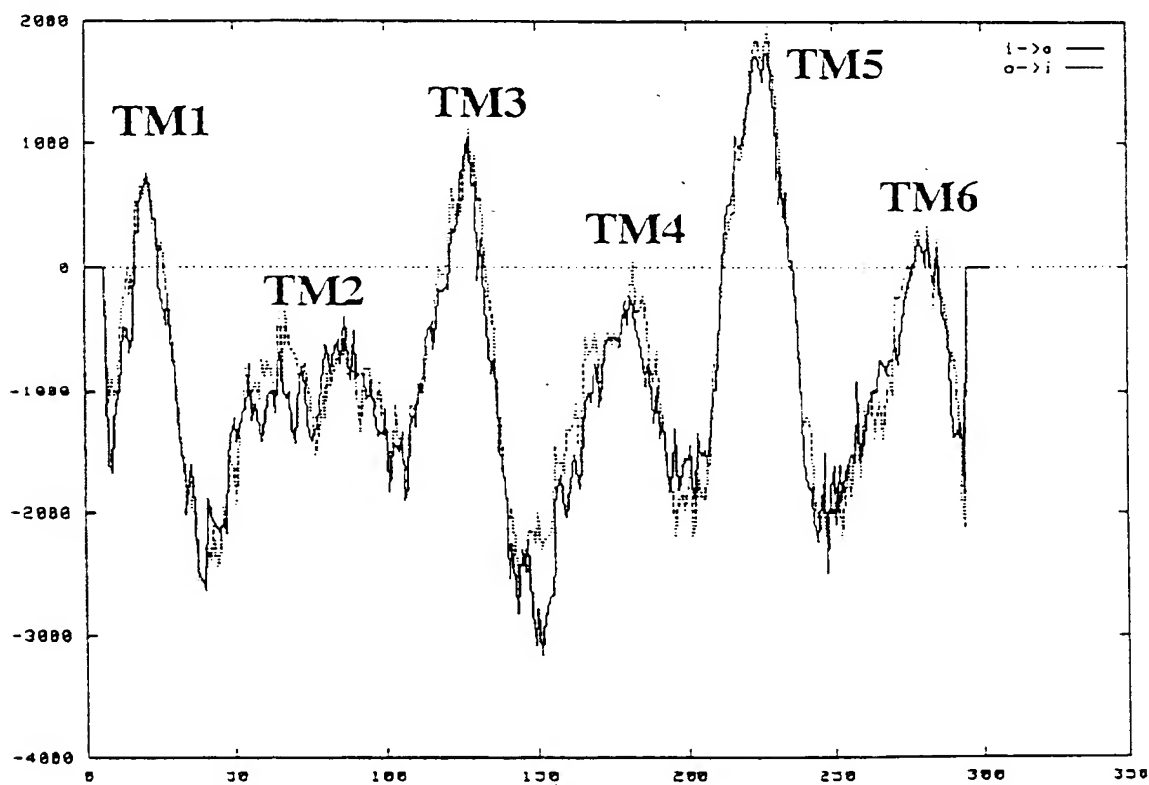
V





4/8

図 4

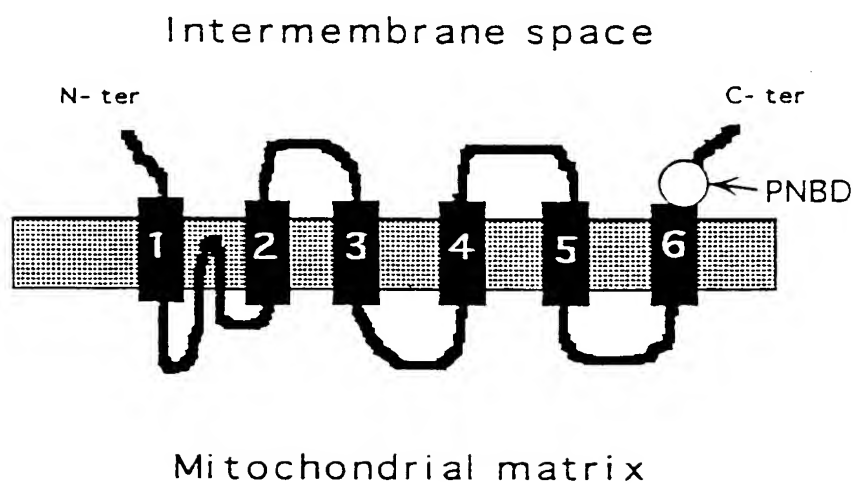


アミノ酸の位置



5/8

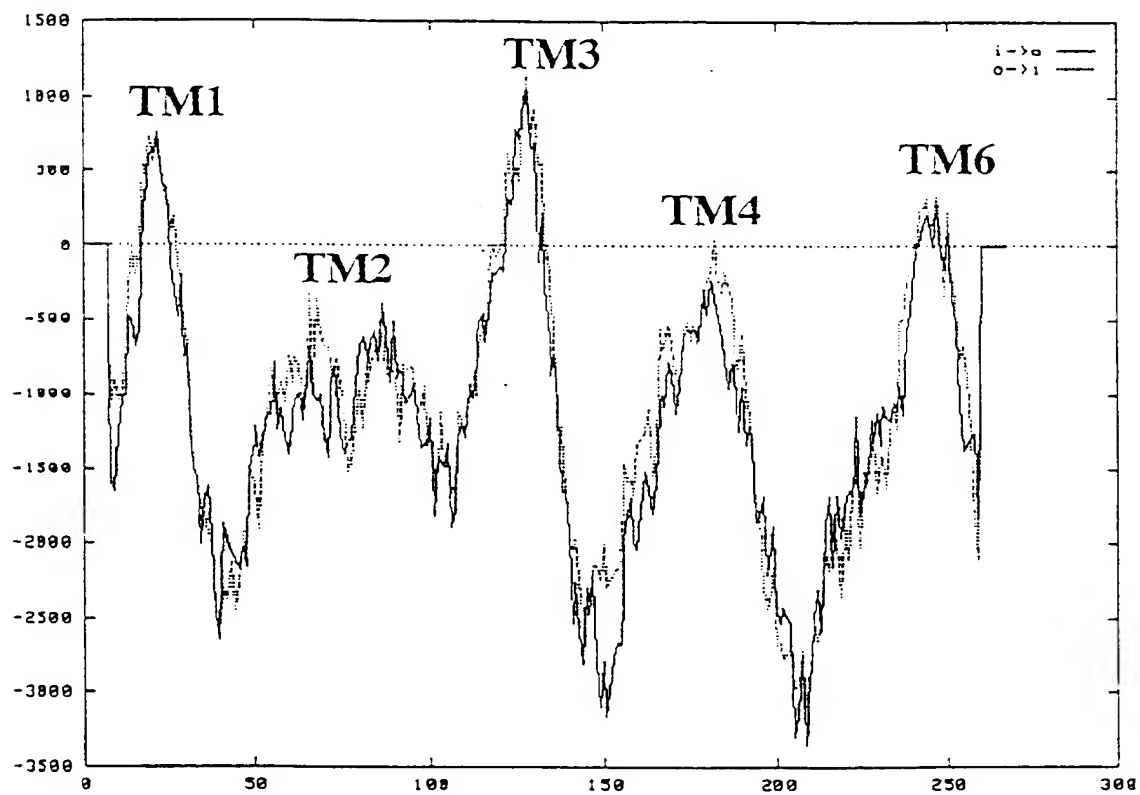
5





6/8

図 6



アミノ酸の位置



7/8

7

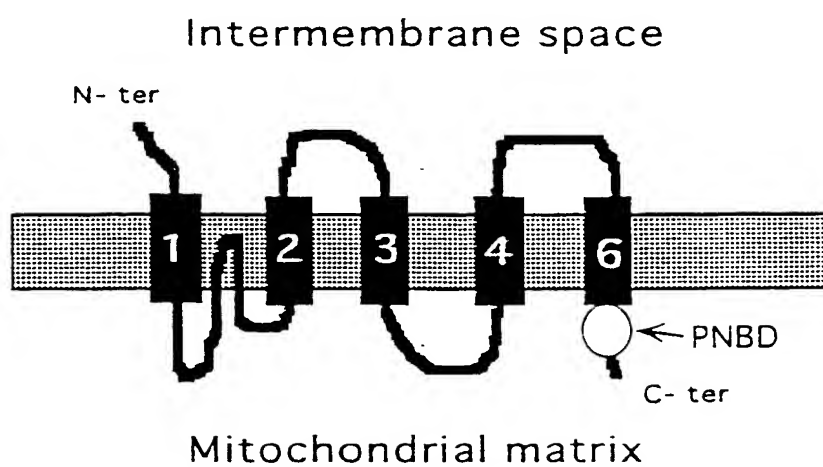
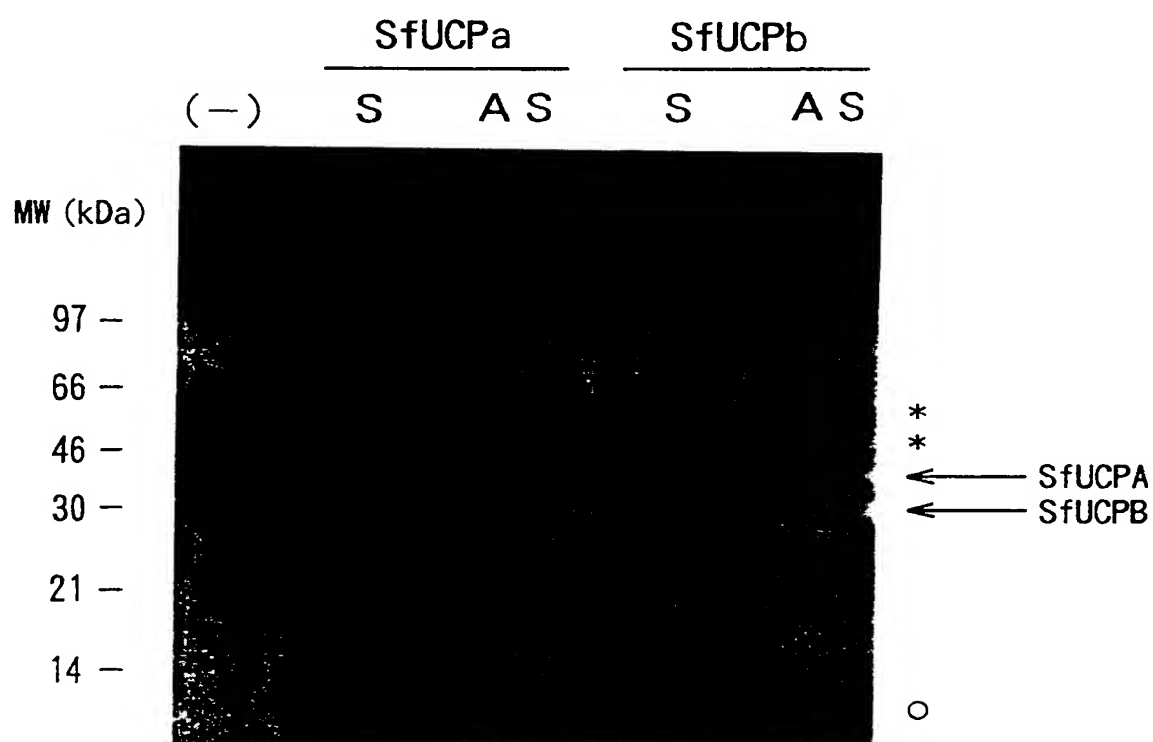




図 8





配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Thermogenesis Genes and Thermogenesis Proteins in Plant

<150> JP11-167439

<151> 1999-06-14

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1525

<212> DNA

<213> *Symplocarpus foetidus*

<220>

<221> CDS

<222> (280).. (1188)

<221> poly A site

<221> (1271).. (1276)

<300>

<301> Ito, K.

<302> Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*)

<303> Plant Sci.

<304> 149

<305>

<306> 167-173

<307> 1999

<308> GenBank AB024733

<309> 2000-02-25



<400> 1

gaggattcgc agaagaaagg ccagaaccog attccttccc gtcttcttct ccttcgcgcc 60
 aattgcagtt ttctgcagcg gcgtcatcat caagaccctc cgcctttccg cgccaaacgc 120
 cttccacccc cacccaatcg ccttcogttt cccgaaatat tcctcttccc tcotcccttt 180
 tcttctctac ataaacccta accaccccat cctctcctcc cgcttcgcac caccctgcat 240
 tctactggga gcccatitga tcgaggtttc ccggcgagg atg ggc gat cac ggc 294

Met Gly Asp His Gly

1

5

ccg agg acc gag atc tcg ttt gcc ggc agt tcg cga gca gca ttc gcc 342
 Pro Arg Thr Glu Ile Ser Phe Ala Gly Ser Ser Arg Ala Ala Phe Ala

10

15

20

gct tgc ttc gcc gag ctt tgc acg att ccg ttg gac act gct aaa gtt 390
 Ala Cys Phe Ala Glu Leu Cys Thr Ile Pro Leu Asp Thr Ala Lys Val

25

30

35

agg ctt caa ctc caa aag aaa gca gta aca ggt gat gtg gtg gct ttg 438
 Arg Leu Gln Leu Gln Lys Lys Ala Val Thr Gly Asp Val Val Ala Leu

40

45

50

cca aaa tac agg gga atg ttg ggc act gtt gcc act att gcc agg gag 486
 Pro Lys Tyr Arg Gly Met Leu Gly Thr Val Ala Thr Ile Ala Arg Glu

55

60

65

gaa ggt ttg tcg gca ctc tgg aaa gga att gta ccc ggt ttg cat cgt 534
 Glu Gly Leu Ser Ala Leu Trp Lys Gly Ile Val Pro Gly Leu His Arg

70

75

80

85

caa tgc ctc ttt gga ggg cta cga att ggg ttg tat gaa cca gtt aag 582
 Gln Cys Leu Phe Gly Gly Leu Arg Ile Gly Leu Tyr Glu Pro Val Lys

90

95

100

tcc ttt tat gtt gga gat aac ttt gtt gga gat att cct tta tcc aag 630
 Ser Phe Tyr Val Gly Asp Asn Phe Val Gly Asp Ile Pro Leu Ser Lys



105	110	115	
aaa ata ctt gct ggg ctt aca aca ggt gca tta gca att ata gtg gca	678		
Lys Ile Leu Ala Gly Leu Thr Thr Gly Ala Leu Ala Ile Ile Val Ala			
120	125	130	
aat ccc act gac ctt gtt aaa gtt cga ctt caa tct gaa ggt aaa ctc	726		
Asn Pro Thr Asp Leu Val Lys Val Arg Leu Gln Ser Glu Gly Lys Leu			
135	140	145	
ccc cct ggg gta cgg aga cgt tat tca ggg gcg cta aat gct tat tca	774		
Pro Pro Gly Val Pro Arg Arg Tyr Ser Gly Ala Leu Asn Ala Tyr Ser			
150	155	160	165
acc ata gtc aaa aag gaa gga ctt ggt gct ctg tgg act ggg ctt ggt	822		
Thr Ile Val Lys Lys Glu Gly Leu Gly Ala Leu Trp Thr Gly Leu Gly			
170	175	180	
cct aat att gcc cgc aat gct att ata aat gct gct gaa ttg gcc agt	870		
Pro Asn Ile Ala Arg Asn Ala Ile Ile Asn Ala Ala Glu Leu Ala Ser			
185	190	195	
tat gat caa gtg aaa cag aca atc tta aaa tta cca gga ttc tca gat	918		
Tyr Asp Gln Val Lys Gln Thr Ile Leu Lys Leu Pro Gly Phe Ser Asp			
200	205	210	
aat att ttt act cat att tta gcc ggt ctg ggg gca ggt ttt ttt gcc	966		
Asn Ile Phe Thr His Ile Leu Ala Gly Leu Gly Ala Gly Phe Phe Ala			
215	220	225	
gtc tgt atc ggt tct cct gtt gat gtg atg aag tct aga atg atg gga	1014		
Val Cys Ile Gly Ser Pro Val Asp Val Met Lys Ser Arg Met Met Gly			
230	235	240	245
gat tca gcc tac aaa agc aca ttt gat tgt ttc atc aag aca ttg aaa	1062		
Asp Ser Ala Tyr Lys Ser Thr Phe Asp Cys Phe Ile Lys Thr Leu Lys			
250	255	260	



aat gat ggg ctt ctt gct ttt tac aag ggg ttt atc cca aac ttt ggt 1110
 Asn Asp Gly Leu Leu Ala Phe Tyr Lys Gly Phe Ile Pro Asn Phe Gly
 265 270 275
 cgg tta gga tcg tgg aat gtg atc atg ttt ttg acc ttg gag cag gtc 1158
 Arg Leu Gly Ser Trp Asn Val Ile Met Phe Leu Thr Leu Glu Gln Val
 280 285 290
 aag aag ttt ttc atc aaa gag gtg cca aat taatacattg aactcggata 1208
 Lys Lys Phe Phe Ile Lys Glu Val Pro Asn
 295 300
 ggagtagaaa gaaaggggtt ttgtggaatt ttctctaccg gtgtggatcc tggcgagaga 1268
 caaataaatc ttctgtactg ctccagatgtg tacctttttt atgaatggtt cttttcttat 1328
 agaggacaga gaaaagaaaa aaaaaatcat tgatcatttac tctttttccc catttctgct 1388
 gctaattcttg gtaggagaag aaaagtctta cattgagtga taacgttggt ctctgcatcc 1448
 attatttttc agagatacta ttgacacat gaaaagtaat gcacatcagg ttttttttaa 1508
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 1525

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> Symplocarpus foetidus

<400> 2

Met Gly Asp His Gly Pro Arg Thr Glu Ile Ser Phe Ala Gly Ser Ser

1

5

10

15

Arg Ala Ala Phe Ala Ala Cys Phe Ala Glu Leu Cys Thr Ile Pro Leu

20

25

30

Asp Thr Ala Lys Val Arg Leu Gln Leu Gln Lys Lys Ala Val Thr Gly

35

40

45

Asp Val Val Ala Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Met Leu Gly Thr Val Ala



50 55 60
Thr Ile Ala Arg Glu Glu Gly Leu Ser Ala Leu Trp Lys Gly Ile Val
65 70 75 80
Pro Gly Leu His Arg Gln Cys Leu Phe Gly Gly Leu Arg Ile Gly Leu
85 90 95
Tyr Glu Pro Val Lys Ser Phe Tyr Val Gly Asp Asn Phe Val Gly Asp
100 105 110
Ile Pro Leu Ser Lys Lys Ile Leu Ala Gly Leu Thr Thr Gly Ala Leu
115 120 125
Ala Ile Ile Val Ala Asn Pro Thr Asp Leu Val Lys Val Arg Leu Gln
130 135 140
Ser Glu Gly Lys Leu Pro Pro Gly Val Pro Arg Arg Tyr Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Asn Ala Tyr Ser Thr Ile Val Lys Lys Glu Gly Leu Gly Ala Leu
165 170 175
Trp Thr Gly Leu Gly Pro Asn Ile Ala Arg Asn Ala Ile Ile Asn Ala
180 185 190
Ala Glu Leu Ala Ser Tyr Asp Gln Val Lys Gln Thr Ile Leu Lys Leu
195 200 205
Pro Gly Phe Ser Asp Asn Ile Phe Thr His Ile Leu Ala Gly Leu Gly
210 215 220
Ala Gly Phe Phe Ala Val Cys Ile Gly Ser Pro Val Asp Val Met Lys
225 230 235 240
Ser Arg Met Met Gly Asp Ser Ala Tyr Lys Ser Thr Phe Asp Cys Phe
245 250 255
Ile Lys Thr Leu Lys Asn Asp Gly Leu Leu Ala Phe Tyr Lys Gly Phe
260 265 270
Ile Pro Asn Phe Gly Arg Leu Gly Ser Trp Asn Val Ile Met Phe Leu



275 280 285
Thr Leu Glu Gln Val Lys Lys Phe Phe Ile Lys Glu Val Pro Asn
290 295 300

<210> 3

<211> 2991

<212> DNA

<213> *Symplocarpus foetidus*

<220>

<221> CDS

<222> (286).. (1089)

<221> poly A site

<222> (1171) (1176)

<221> poly A site

<222> (1243) (1248)

<300>

<301> Ito, K.

<302> Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*)

<303> Plant Sci.

<304> 149

<305>

<306> 167-173

<307> 1999

<308> GenBank AB024734

<309> 2000-02-25

<400> 3

tggtggtgac gagtgacgag gattgcgaga agaaaggcca gaacccgatt ccttcccgtc 60



ttctttctcct tccgcccaat tgcagttttt cgcagcgggt catcatcaag accctccgcc 120
 tttccgcgcc aaacgccttc cacccaatcc ctccgtttcc cgaaatattc cctttccctc 180
 ccttttcttc tctacataaa ccctaaccac ccccatcctc tcttcccgt tccgaccacc 240
 ctgcattcta ctgggatccc attgatcga cgtttcccg cgagg atg ggc gat cac 297

Met Gly Asp His

1

ggc ccg agg acc gag atc tcg ttt gcc ggc agt tcg cga gca gca ttc 345
 Gly Pro Arg Thr Glu Ile Ser Phe Ala Gly Ser Ser Arg Ala Ala Phe
 5 10 15 20
 gcc gct tgc ttc gcc gag ctc tgt acg att ccg ttg gac act gct aaa 393
 Ala Ala Cys Phe Ala Glu Leu Cys Thr Ile Pro Leu Asp Thr Ala Lys
 25 30 35
 gtt agg ctt cag ctc caa aag aaa gca gta aca ggt gat gtg gtg gct 441
 Val Arg Leu Gln Leu Gln Lys Lys Ala Val Thr Gly Asp Val Val Ala
 40 45 50
 ttg cca aaa tac agg gga atg ttg ggc act gtt gcc act att gcc agg 489
 Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Met Leu Gly Thr Val Ala Thr Ile Ala Arg
 55 60 65
 gag gaa ggt ttg tcg gca ctc tgg aaa gga att gta ccc ggt ttg cat 537
 Glu Glu Gly Leu Ser Ala Leu Trp Lys Gly Ile Val Pro Gly Leu His
 70 75 80
 cgt caa tgc ctc ttt gga ggg cta cga att ggg ttg tat gaa cca gtt 585
 Arg Gln Cys Leu Phe Gly Gly Leu Arg Ile Gly Leu Tyr Glu Pro Val
 85 90 95 100
 aag tcc ttt tat gtt gga gat aac ttt gtt gga gat att cct tta tcc 633
 Lys Ser Phe Tyr Val Gly Asp Asn Phe Val Gly Asp Ile Pro Leu Ser
 105 110 115
 aag aaa ata ctt gct ggg ctt aca aca ggt gca tta gca att ata gtg 681



Lys Lys Ile Leu Ala Gly Leu Thr Thr Gly Ala Leu Ala Ile Ile Val
 120 125 130
 gca aat ccg act gac ctt gtt aaa gtt cga ctt caa tct gaa ggt aaa 729
 Ala Asn Pro Thr Asp Leu Val Lys Val Arg Leu Gln Ser Glu Gly Lys
 135 140 145
 ctc ccc cct ggg gta cca aga cgt tat tca ggg gcg cta aat gct tat 777
 Leu Pro Pro Gly Val Pro Arg Arg Tyr Ser Gly Ala Leu Asn Ala Tyr
 150 155 160
 tca acc ata gtc aaa aag gaa gga ctt ggt gct ctg tgg act ggg ctt 825
 Ser Thr Ile Val Lys Lys Glu Gly Leu Gly Ala Leu Trp Thr Gly Leu
 165 170 175 180
 ggt cct aat att gcc cgc aat gct att ata aat gct gct gaa ttg gcc 873
 Gly Pro Asn Ile Ala Arg Asn Ala Ile Ile Asn Ala Ala Glu Leu Ala
 185 190 195
 agt tat gat caa gtg aaa cag atg aag tct aga atg atg gga gat tca 921
 Ser Tyr Asp Gln Val Lys Gln Met Lys Ser Arg Met Met Gly Asp Ser
 200 205 210
 gcc tac aaa agc aca ttt gat tgt ttc atc aag acg ttg aaa aat gat 969
 Ala Tyr Lys Ser Thr Phe Asp Cys Phe Ile Lys Thr Leu Lys Asn Asp
 215 220 225
 ggg cct ctt gct ttt tac aag ggg ttt atc cca aac ttt ggt cgg tta 1017
 Gly Pro Leu Ala Phe Tyr Lys Gly Phe Ile Pro Asn Phe Gly Arg Leu
 230 235 240
 gga tcg tgg aat gtg atc atg ttt ttg acc ttg gag cag gtc aag aag 1065
 Gly Ser Trp Asn Val Ile Met Phe Leu Thr Leu Glu Gln Val Lys Lys
 245 250 255 260
 ttc ttc atc aaa gag gtg cca aat taatacattg aagtcggata ggagtagaaa 1119
 Phe Phe Ile Lys Glu Val Pro Asn



265

aaaagggttt ttgtggaatt ttctctaccg gtgtggatcc tggcgagaga gaataaatct 1179
tcctgactgc tcagatgttg tacctttttt atgaatggtt cttttcttat agaggacaga 1239
gaaaataaaa gaaaaattca ttgtcatgta ctctttttcc ccatttctgc tgagtagcag 1299
ctataccaag cagactttgt tgcttggctg ctgctaactt ttagctgaa gaaaagtctt 1359
acattgagtg ataacgttgt tctctgcac cttattttt cagagttact atttgacaca 1419
tgaaaagttt tttttttttt tttttttttt aacaggcagc aaatagagga atcgatctca 1479
cgactatcct ctttattcat taacaggcat acaaacttag ggagagcatg cagggtatat 1539
atcaaaatat acccttttat tagacatttt gcgtacacag ttggctctca aacgactgta 1599
tctagcagcc aattttttag ccacattaag acagagagaa acaagcagaa gaacagggtta 1659
ccatacatat ataggtaata attaatgaga tgaacatagc atagggttat gatctacttc 1719
ttcttcacgt acacatgatg caccagctga atgggaatct tggtcacat atggcatgaa 1779
agtacgtcat gtgcagacgt tatatagtgt tcttcttacc attcagcagc agcaccagag 1839
gcatcaaaca ctgggggtctt gacagggtat gaggggtaca ttgcgatccc acacatgccg 1899
tagggagtca cattgcgttt gatttttatg tatccagcct gtccccacct agtgccccat 1959
gagttcctta caagccaata atccttccca tcctccgaac catatcctat tatcaccaca 2019
gcatggctga tacgttgacc acatgggtcca gcaaatacgc ccgagggtga gtgttggaat 2079
ccagcgcccg aagcctcaag agcaacactg acaggttgct ttgcgactgc atactgtagg 2139
ctaacctcgt tgtacggaga aacattttca tacgcatcaa tcgagggtgac tttaataaga 2199
tttgctctgc aagttcctcg acgtcctgtg tacgggtaat ttttgaataa aggagaaggg 2259
cggaagaag cgcgcgtctc tgctcgcgac ggggttaattc ttcatatggc cacttcgagc 2319
atggcttcgg cagcctccag cttcgttctc actccggcct cccctccacc accacgccgg 2379
ttccccgctc cgccttcttt ccaggggtcg caggaggctc gtggtggtgc gggccgagga 2439
agccgcgacg acccccgccc ccggcgccgg cggaggggagc cgcgccgccc ccccaagcc 2499
gccaccgatc gggcccaaga ggggggtcaaa ggttgatata tagttcttaa tttctttccc 2559
gtgtggcttc tggagttaga tttgtttcct cttctctttt tttgtttgt ttttcaatt 2619
taaattttat tctcatctgt ggacgacctt ccatcggggt tttcgtccct ctgcgagtg 2679
aagatctccg gaaggaatcc tactgggtca acggtgtcgg atcggtggtg gctgttgatc 2739



aggatccggc gactogatac ccggtcgtgg ttcggttcac caaggtcaac tatgcgaacg 2799
 tctcgaccaa caactacgca ctggacgaga tcctggaggt gaaatgaggg tcggcgggcg 2859
 tggtcggtcg ggcatgtcac gatgatgtat tttcgcagtt ggtagtgtaa aataccatgt 2919
 cattcgtgta aaactctttc gttcgccaaa tcctcagttg aaattttaat tcccagccag 2979
 taataaaaaa aa 2991

<210> 4

<211> 268

<212> PRT

<213> Symplocarpus foetidus

<400> 4

Met Gly Asp His Gly Pro Arg Thr Glu Ile Ser Phe Ala Gly Ser Ser

1 5 10 15

Arg Ala Ala Phe Ala Ala Cys Phe Ala Glu Leu Cys Thr Ile Pro Leu

20 25 30

Asp Thr Ala Lys Val Arg Leu Gln Leu Gln Lys Lys Ala Val Thr Gly

35 40 45

Asp Val Val Ala Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Met Leu Gly Thr Val Ala

50 55 60

Thr Ile Ala Arg Glu Glu Gly Leu Ser Ala Leu Trp Lys Gly Ile Val

65 70 75 80

Pro Gly Leu His Arg Gln Cys Leu Phe Gly Gly Leu Arg Ile Gly Leu

85 90 95

Tyr Glu Pro Val Lys Ser Phe Tyr Val Gly Asp Asn Phe Val Gly Asp

100 105 110

Ile Pro Leu Ser Lys Lys Ile Leu Ala Gly Leu Thr Thr Gly Ala Leu

115 120 125

Ala Ile Ile Val Ala Asn Pro Thr Asp Leu Val Lys Val Arg Leu Gln



130 135 140
Ser Glu Gly Lys Leu Pro Pro Gly Val Pro Arg Arg Tyr Ser Gly Ala
145 150 155 160
Leu Asn Ala Tyr Ser Thr Ile Val Lys Lys Glu Gly Leu Gly Ala Leu
165 170 175
Trp Thr Gly Leu Gly Pro Asn Ile Ala Arg Asn Ala Ile Ile Asn Ala
180 185 190
Ala Glu Leu Ala Ser Tyr Asp Gln Val Lys Gln Met Lys Ser Arg Met
195 200 205
Met Gly Asp Ser Ala Tyr Lys Ser Thr Phe Asp Cys Phe Ile Lys Thr
210 215 220
Leu Lys Asn Asp Gly Pro Leu Ala Phe Tyr Lys Gly Phe Ile Pro Asn
225 230 235 240
Phe Gly Arg Leu Gly Ser Trp Asn Val Ile Met Phe Leu Thr Leu Glu
245 250 255
Gln Val Lys Lys Phe Phe Ile Lys Glu Val Pro Asn
260 265



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03806

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/29, C07K14/415

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/29, C07K14/415

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Ito, K., "Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (<i>Symplocarpus foetidus</i>)", Plant Science (December, 1999), Vol.149, No.2, pp.167-173	1-6
PX	Ito, K. "A cold-inducible gene encoding uncoupling protein in thermogenic plant species" Cryobiology and Cryotechnology (December, 1999), Vol.45, No.2, pp.43-46	1-6
PY	Ricquier, D. et al., "The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP", Biochem. J. (2000) Vol.345, No.2, pp.161-179	1-6
PY	Watanabe, A. et al., "AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of <i>Arabidopsis thaliana</i> " Plant Cell Physiol. (November, 1999), Vol.40, No.11, pp.1160-1166	1-6
X	Maia I.G. et al. "AtPUMP: an Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein", FEBS lett. (1998), Vol.429, pp.403-406	5-6
A		1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
23 August, 2000 (23.08.00)

Date of mailing of the international search report
05 September, 2000 (05.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03806

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Laloi, M. et al., "A plant cold-induced uncoupling protein", Nature (1997), Vol.389, pp.135-136	5-6 1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/29, C07K14/415

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/29, C07K14/415

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/DBJ/EMBL/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Ito, K. "Isolation of two distinct cold-inducible cDNAs encoding plant uncoupling proteins from the spadix of skunk cabbage (<i>Symplocarpus foetidus</i>)" <i>Plant Science</i> (1999, Dec.) 第149巻 第2号 p.167-173	1-6
PX	Ito, K. "A cold-inducible gene encoding uncoupling protein in thermogenic plant species" <i>Cryobiology and Cryotechnology</i> (1999, Dec.) 第45巻 第2号 p.43-46	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PY	Ricquier, D. et al. "The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP" Biochem. J. (2000) 第345巻 第2号 p. 161-179	1-6
PY	Watanabe, A. et al. "AtUCP2: a novel isoform of the mitochondrial uncoupling protein of Arabidopsis thaliana" Plant Cell Physiol. (1999, Nov.) 第40巻 第11号 p. 1160-1166	1-6
<u>X</u> A	Maia I. G. et al. "AtPUMP: an Arabidopsis gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein" FEBS lett. (1998) 第429巻 p. 403-406	<u>5-6</u> 1-4
<u>X</u> A	Laloi, M. et al. "A plant cold-induced uncoupling protein" Nature (1997) 第389巻 p. 135-136	<u>5-6</u> 1-4